การหา degree of methyl esterification ของเพคตินจากเปลือกแก้วมังกร
Determination of degree of methyl esterification of pectin from dragon fruit (*Hylocereus undatus,* Britt.& Rose) skin

ปาริฉัตร หยวกแฟง[1] **นฤมล เผือกขาว**[1] **และ อรนาถ สุนทรวัฒน์**[1]
Parichat Yuagfang[1] Narumol Purkkao[1] and Oranart Suntornwat[1]

Abstract

Cell wall material from the skin of dragon fruits (*Hylocereus undatus* , Britt.& Rose) was prepared by refluxing the dried skin with toluene:ethanol (38:62) followed by water extraction . The pectic polysaccharides were sequentially extracted from the cell wall with water and EDTA . The degree of methyl esterification (DME) of pectin fractions was determined using the titrimetric method and Fourier transform – infared (FT-IR) spectroscopy. The uronic acid content was also monitored by spectrophotometric method . The DME of water and EDTA fractions was 60.71 and 54.14% respectively . The uronic acid content were 234.4 and 70.76 mg/g fraction

Keywords: dragon fruit , pectin , uronic acid

บทคัดย่อ

ผนังเซลล์จากเปลือกผลแก้วมังกรเตรียมได้จากการ reflux เปลือกแห้งด้วย toluene:ethanol (38:62) ตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ ส่วนของเพคตินจะถูกแยกออกจากผนังเซลล์โดยการสกัดด้วยน้ำและ EDTA การหา degree of methyl esterification (DME) ของเพคตินนั้นทำได้โดยการไตเตรตและ FT-IR ปริมาณของกรดยูรอนิก ในเพคตินแต่ละส่วนสามารถหาได้โดยใช้เทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตตรี พบว่าค่า DME ของเพคตินที่ละลายในน้ำและใน EDTA มีค่าเท่ากับ 60.71 และ 54.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดยูรอนิกของเพคตินที่ละลายในน้ำและใน EDTA จะเท่ากับ 234.4 และ 70.76 มิลลิกรัม/กรัม

คำสำคัญ: แก้วมังกร เพคติน กรดยูรอนิก

คำนำ

เพคตินจัดเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างหลากหลาย โดยพบอยู่ในช่วง 30 ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ ของโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชใบเลี้ยงคู่ โครงสร้างของเพคตินจะเชื่อมโยงกับโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่น เพื่อช่วยให้ความแข็งแกร่งและยืดหยุ่นกับโครงสร้างของผนังเซลล์ (Carpita and Gilbeaut,1993) องค์ประกอบหลักของเพคตินจะเป็น homogalacturonan ซึ่งเป็นโพลีเมอร์สายตรงของ **α**-D-galacturonic acid ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ **α**-1,4 ไกลโคซิดิก ในตอนแรกนั้นเพคตินจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาในรูปที่หมู่คาร์บอกซิลิกของ galacturonic acid ถูกเอสเทอริไฟด์ในอัตราส่วนที่สูง จากนั้นจึงจะมีการดึงหมู่ที่มาเอสเทอริไฟด์นี้ออกไป (Brummell and Harpster,2001) degree of methyl esterification (DME) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับพัฒนาการของเซลล์และในกรณีที่มีศัตรูพืชมารุกราน (Giovane *et al*., 2004) อัตราส่วนและการกระจายตัวของหมู่คาร์บอกซิลิกอิสระ กับที่ถูกเอสเทอริไฟด์ในโมเลกุลของ homogalacturonan จะมีผลต่อคุณสมบัติของเพคตินและความแข็งแกร่งของผนังเซลล์ ในอุตสาหกรรมอาหาร เพคตินมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับเนื้อสัมผัสของอาหาร เพราะเป็นสารที่ทำให้เกิดลักษณะเป็นเจลและความข้น คุณสมบัติในการเป็นเจลนี้จะขึ้นอยู่กับ DME และมวลโมเลกุลของเพคติน (Barros *et al*., 2002)

แก้วมังกร (*Hylocereus undatus*, Britt.& Rose) เป็นพืชในตระกูลกระบองเพชร มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลางและมีปลูกแพร่หลายในเวียดนาม ดอกจะเกิดบริเวณปลายกิ่งในช่วงเดือนเมษายน เมื่อบานมีลักษณะคล้ายปากแตร จะบานใน ช่วงหัวค่ำจนถึงเช้า เมื่อติดผลแล้ว ผลอาจมีสีชมพูหรือเหลือง เนื้อผลภายในมีทั้งสีขาวและแดงขึ้นอยู่กับพันธุ์ และมีเมล็ดสีดำอยู่ในเนื้อผล แก้วมังกรเป็นผลไม้สุขภาพ ที่มีรสชาติอร่อยเป็นผลไม้ที่รับประทานได้แต่เนื้อ ส่วนเปลือกจะถูกทิ้งไปอย่างไร้

[1] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000
[1] Division of Chemistry , Silpakorn University, Sanarmchandrapalace Campus, Nakhonpathom , 73000

ประโยชน์ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกแก้วมังกร การวิจัยในครั้งนี้จึงทำการสกัดและศึกษาเพคตินซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีการใช้ประโยชน์จากเปลือกแก้วมังกรเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับชนิดและโครงสร้าง

อุปกรณ์และวิธีการ

นำแก้วมังกรมาปอกเปลือก แล้วเอาเฉพาะเปลือกไปอบจนได้น้ำหนักคงที่ ต่อมา reflux ด้วย toluene:ethanol (38:62) และตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ จะได้ผนังเซลล์ หลังจากนั้นนำผนังเซลล์มาทำการสกัดต่อด้วยน้ำ และ EDTA ที่ 60°C ทำให้ได้เพคตินที่ละลายในน้ำและใน EDTA ตามลำดับ นำผนังเซลล์และเพคตินทั้ง 2 ส่วนมาหา degree of methyl esterification (DME) ด้วยวิธีการไตเตรตและ FT-IR ส่วนการหาปริมาณของกรดยูรอนิกของผนังเซลล์และเพคตินที่ผ่านการกำจัดแป้งและย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริกแล้ว ด้วยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตตรี (Blumenkrantz and Asboe – Hansen , 1973)

ผล

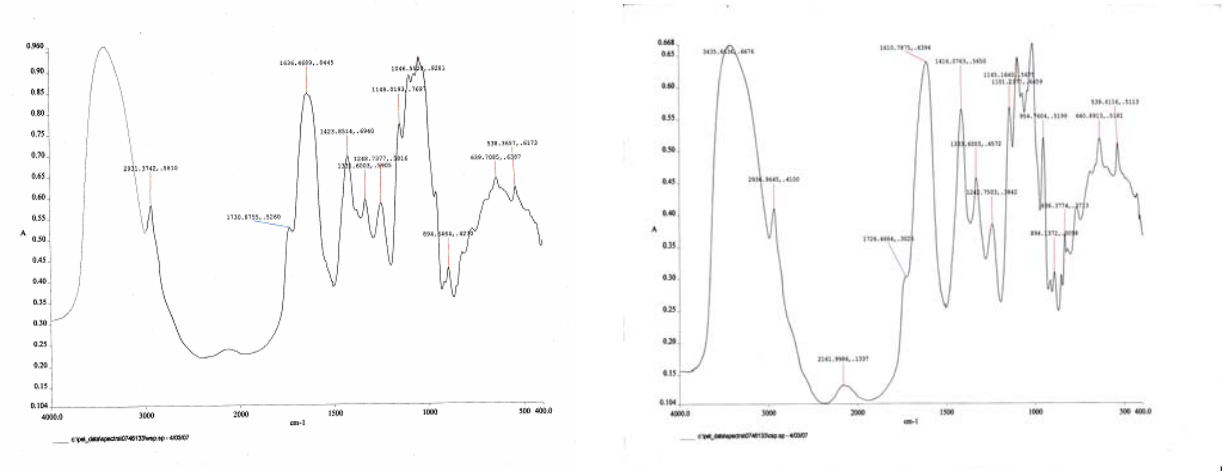
เมื่อนำผนังเซลล์ที่สกัดได้จากเปลือกแห้งมาสกัดต่อด้วยน้ำและ EDTA แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเอธานอลจะได้เพคตินที่ละลายในน้ำและใน EDTA ที่มีลักษณะเป็นวุ้นสีขาว และพบว่าผนังเซลล์จากเปลือกแก้วมังกรมีส่วนประกอบที่เป็นเพคตินที่ละลายใน EDTA มากกว่าเพคตินที่ละลายในน้ำ (Table 1)

Table 1 Yield of pectin fraction from dragon fruit skin

Pectin fraction	Yield % cell wall polysaccharide
water soluble	1.68
EDTA soluble	12.54

จาก FT-IR spectra ของเพคตินที่ละลายในน้ำและใน EDTA พบว่าจะปรากฏพีคที่สำคัญคือที่สัญญาณความถี่ 3370 cm^{-1}, 3435 cm^{-1} เกิดจาก O-H stretching สัญญาณความถี่ 2931 cm^{-1}, 2936 cm^{-1} เป็นสัญญาณที่เกิดจาก C-H stretching ส่วนสัญญาณที่ความถี่ 1730 cm^{-1},1726 cm^{-1} เกิดจาก ester carbonyl groups stretching และที่ความถี่ 1636 cm^{-1},1610 cm^{-1} เกิดจาก carboxylate ion stretching (Figure 1)

การหา degree of methyl esterification ของผนังเซลล์และเพคตินทั้ง 2 ส่วนทำได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่สัญญาณความถี่ 1730 cm^{-1} หารด้วยผลรวมค่าการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 1730 cm^{-1} กับ 1600 cm^{-1} แล้วนำไปคำนวณหา degree of methyl esterification ใน calibration curve ของเพคตินมาตรฐาน ซึ่งสามารถยืนยันผลของค่า degree of methyl esterification จาก FT-IR ได้ด้วยการเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากวิธีไตเตรต พบว่าค่าที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกันมาก (Table 2)



a. b.

Figure 1 FT-IR spectra of a. water soluble pectin b. EDTA soluble pectin

Table 2 Degree of methyl esterification of cell wall material , and pectin fraction from dragon fruit skin

Method	Degree of methyl esterification (%)		
	cell wall material	water soluble pectin	EDTA soluble pectin
FT-IR	56.05	60.71	54.14
Tritimetric	53.68±1.69 *	-**	-**

* mean ±SD , n=3

** หมายเหตุ เพคตินที่ละลายในน้ำ และที่ละลายใน EDTA ไม่ได้ทำการหา degree of methyl esterification (DME) โดยวิธีไตเตรต เนื่องจากสารที่สกัดได้ไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ แต่จากการพิจารณาค่า DME ของผนังเซลล์ทั้ง 2 วิธีแล้วมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นคาดว่าถ้านำ เพคตินทั้ง 2 ส่วนมาหา DME ด้วยวิธีการไตเตรตก็น่าจะมีค่าใกล้เคียงกันกับค่าที่ได้จาก FT-IR เหมือนกับผลที่ได้จากผนังเซลล์

จากการหาปริมาณกรดกาแลคทูโรนิก ของผนังเซลล์และเพคตินที่สกัดได้ พบว่าเพคตินที่ละลายในน้ำมีปริมาณกรดกาแลคทูโรนิกมากที่สุด (Table 3)

Table 3 Uronic acid content of cell wall material , and pectin fraction from dragon fruit skin

Fraction	Uronic(galacturonic) acid	
	mg/g	mol/g
cell wall material	134.5	6.340×10^{-4}
water soluble pectin	234.4	1.105×10^{-3}
EDTA soluble pectin	70.76	3.335×10^{-4}

วิจารณ์ผล

การหา degree of methyl esterification โดยใช้ FT-IR spectrometry จะพบว่า เพคตินที่ละลายในน้ำมี degree of methyl esterification มากกว่า เพคตินที่ละลายใน EDTA เป็นเพราะ โครงสร้างของเพคตินที่ละลายใน EDTA จะมีการเชื่อมต่อของสายโพลีแซคคาไรด์ด้วย Ca^{2+} bridge ตรงบริเวณหมู่คาร์บอกซิลิกทำให้โอกาสในการเกิด methyl esterification น้อยลง

การย่อยสลายเพคตินด้วยสารละลายกรด 12 M H_2SO_4 นั้นเนื่องจากเพคตินเป็นโมเลกุลที่มีสายหลักเป็น homo-galacturonan ถ้าต้องการวิเคราะห์หาปริมาณกรดกาแลคทูโรนิก จึงต้องมีการใช้กรด 12 M H_2SO_4 เพื่อไปตัดพันธะ α -1,4 ไกลโคซิดิก แล้วจึงนำกรดกาแลคทูโรนิก ที่เป็นหน่วยย่อย ไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตตรี พบว่าเพคตินที่ละลายในน้ำมีปริมาณกรดกาแลคทูโรนิกมากกว่าที่ละลายใน EDTA ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงความแตกต่างในด้านของโครงสร้าง โดยที่โครงสร้างของเพคตินที่ละลายในน้ำจะมี homogalacturonan เป็นหลัก ส่วนเพคตินที่ละลายใน EDTA น่าจะเป็น substituted galacturonans

สรุป

จากการทำการวิจัยเพื่อหาคุณสมบัติทางกายภาพของเพคตินที่สกัดได้จากเปลือกแก้วมังกร พบว่าผนังเซลล์ของเปลือกแก้วมังกรมีเพคตินส่วนที่ละลายใน EDTA มากกว่าส่วนที่ละลายในน้ำอยู่ 7.46 เท่า โดยที่เพคตินที่ละลายในน้ำมีปริมาณกรดยูรอนิก 1.105 mmol/g และเพคตินที่ละลายใน EDTA มีปริมาณกรดยูรอนิก 0.3335 mmol/g ส่วนข้อมูลที่ได้จาก FT-IR spectra ก็ปรากฏพีคที่สอดคล้องกับโครงสร้างของเพคติน จึงเป็นการยืนยันได้ว่าสารที่สกัดได้จากเปลือกแก้วมังกรนั้นเป็นเพคติน และจากค่า degree of methyl esterification พบว่าเพคตินทั้ง 2 ส่วนที่สกัดได้มีการถูกเอสเทอริไฟด์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงจัดเป็น high-methoxyl pectin

เอกสารอ้างอิง

Barros, A.S. et al., 2002. Determination of the degree of methylesterification of pectic polysaccharide by FT-IR using an outer product PLSI regression. Carbohydrate polymer.50:85-94.

Brummell, D.A. and Harster, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. Plant Mol.Biol. 47:311-340.

Blumenkrantz, N, Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. Anal Biochem.54: 484-489.

Carpita, N.C and Gilbeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell wall in flowering plants:consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth. Plant J.3:1-30.

Giovane, A. et al., 2004 . Pectin methylesterase inhibitor. Biochem. Biophys. Acta 1696:245-252.

Habibi,Y., Heyraud,A., Mahrou,M., and Vignon,M.R. 2004. Structural features of pectic polysaccharide from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits .Carbohydrate research.339:1119-1127.

Singthong, J., Cui,S.W., Ningsanond,S. and Goff,H.D. 2004. Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. Carbohydrate Polymer.58:391-400.

Synytsya,A., Copikova,J., Matejka,P. and Machovic V. 2003. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectin. Carbohydrate Polymer. 54: 97-106.